Validierung in der Chromatographie

Inhaltsverzeichnis:

Einführung

1 Validierung

Validierung ist nach EEC-GMP-Guide die Beweisführung in Übereinstimmung mit der GMP, dass Verfahren, Prozesse, Ausrüstungsgegenstände, Materialien, Arbeitsgänge oder -systeme tatsächlich zu den erwarteten Ergebnissen führen!

2 Regelwerke

Validierung von automatisierten Systemen	Good Automated Manufacturing Practice (GAMP), 1996
Validierung von Software-Packages	ISO 9000-3
Validierung von (Analysen-)Methoden	Good Laboratory Practice (GLP)

3 Anforderungen

1.1 Grundsätzlich

Systematische Dokumentation!

4 Allgemeines

Jedes Ergebnis hat nur dann einen Wert, wenn die Bedingungen, unter denen die Ergebnisse erzielt wurden, abgesichert und dokumentiert sind!

Gleichzeitig sind Messwerte nur brauchbar, wenn sichergestellt ist, dass die Messinstrumente kalibriert sind (d.h. mit geeigneten Messnormen abgeglichen sind) und ggf. entsprechend ihrem Einsatzzweck justiert (d.h. spezifikationsgerecht eingestellt) sind.

Die Labors des Qualitätsmanagement-Bereichs sind naturgemäß mit den Produktionseinheiten intensiv verzahnt, so dass dort eine gleichgerichtete Anwendung geltender Vorschriften und Qualitätsmanagement-Philosophien als gegeben anzunehmen ist. Besondere Bedeutung kommt in diesen Laborbereichen den Komplexen *'Prüfmittelstatus mit Kalibrierung und Justierung'* sowie *'Fragen der Laborsicherheit'* und des *'Allgemeinen Labormanagements'* zu.

Im Bereich der Grundlagenforschung erscheint es durchaus verständlich, dass der Entwickler nicht primär an den Aspekt der Nutzung seiner Unterlagen für die spätere Validierung des Herstellungsprozesses nach GMP-Gesichtspunkten denkt. Dennoch muss von ihm verlangt werden, dass er seine Ergebnisse regelmäßig sauber absichert; dies verlangt schon die Systematik seiner Arbeit. Mehr ist dann für die spätere Prozessentwicklung allerdings auch nicht erforderlich, wenn der oben geschilderte Konflikt beherrscht ist.

Ein weiterer Aspekt zur Beschleunigung des Validierungsverfahrens ist unter dem Stichwort *Upscaling* inzwischen Gemeingut geworden.

Neue Produktionstechnologien werden regelmäßig im Labormaßstab erprobt, d.h. mit kleinen Laboreinheiten, die dann später über Pilotanlagen in die großtechnischen Anlagen im Prozessbetrieb überführt werden. Daraus ergibt sich die Anforderung, dass alle am Prozess beteiligten Einzelschritte scaleup-fähig sein müssen, d.h. bei gleicher Basistechnologie und Wirkungsweise lassen sich sehr kleine und sehr große Produktvolumina verarbeiten. Die Scaleup-Fähigkeit der einzelnen Prozessschritte ist im Rahmen der Validierung zu demonstrieren und zu dokumentieren.

Für das Studium von Prozessverbesserungen oder Veränderungen von Teilschritten oder auch nach Markteinführung ist übrigens auch ein *Downscaling* zurück in den Labormaßstab immer wieder erforderlich. Für validierte Prozessschritte besteht grundsätzlich die Möglichkeit der Veränderung durch Erstellung eines entsprechenden 'change protocols'. Dabei ist allerdings zu erläutern und zu belegen welchem Ziel diese Veränderung dient, und dass mit der neuen Methodik bzw. dem neuen Produkt alle Spezifikationsbestandteile sicher zu erfüllen sind.

5 Zusammenfassung

Validierungsaufwand richtig betrieben und dokumentiert hilft in gleicher Weise den Anforderungen des Entwicklers und der Prozesstechnologen für die Dokumentation ihrer Arbeit und Wiederverwendbarkeit ihrer Ergebnisse wie der Verwendbarkeit der Daten im Rahmen der späteren Prozessvalidierung unter Prozessbedingungen. Der Einsatz scaleup-fähiger Prozesskomponenten ist wichtig, um den Validierungsaufwand für einzelne Prozessschritte auf ein Minimum zu reduzieren.

6 Nachwort

Ohne Zweifel ist die pharmazeutische Industrie in besonderer Weise mit Vorschriften und Kontrollen reguliert (s.o.). Die hier exemplarisch angerissene Methodik wird jedoch zunehmend auch in anderen Bereichen Anwendung finden oder teilweise schon angewandt, um wirtschaftliche Ziele bei der Produktentwicklung zu realisieren.

7 Fachausdrücke des Qualitätsmanagements

GMP	-	Good Manufacturing Practices	-	Grundsätze guter Herstellungspraxis
FDA	-	Food and Drug Administration	-	Amerikanische Behörde für Lebens- und Arzneimittel
SOP	-	Standard Operating Procedure	-	Verfahrensanweisung
Lot	-	Bei diskontinuierlicher Fertigung die Menge eines Produktes, die in einem Herstellungsprozess aus Vorprodukten jeweils nur einer Charge hergestellt wird		
Validierung	-	Beweisführung in Übereinstimmung mit GMP, dass Verfahren, Prozesse, Ausrüstungsgegenstände, Materialien, Arbeitsgänge oder Systeme tatsächlich zu den erwarteten Ergebnissen führen		
Audit	-	Überprüfung, ob die Regeln der GMP erfüllt werden, und auch um Verbesserungsvorschläge zu ermitteln		

Lexikalische Definitionen zur Validierung

1 Duden, Das Fremdwörterbuch, 1982

valid: 1. kräftig, gesund
2. rechtskräftig

Validation: Gültigkeitserklärung

validieren: etwas für rechtsgültig erklären, geltend machen, bekräftigen

Validität: 1. Rechtsgültigkeit
2. Gültigkeit eines wissenschaftlichen Versuchs
3. Übereinstimmung eines Ergebnisses (einer Meinungsumfrage) mit dem tatsächlichen Sachverhalt (Soziologie, Psychologie)

2 Der große Brockhaus, 1983

Validität: Die Gültigkeit einer Meßmethode in der empirischen Sozialforschung, vor allem eines standardisierten psychologischen Tests, eines der Hauptgütekriterien, das im Unterschied zur Reliabilität angibt, inwieweit die Testresultate tatsächlich das erfassen, was durch den Test bestimmt werden soll.

Die Art der Gültigkeitsprüfung (Validierung) richtet sich nach der jeweiligen diagnostischen Schlussweise:

- Eine inhaltliche Validierung ist notwendig, wenn das Testverfahren als repräsentative Stichprobe der zu erschließenden Verhaltensgesamtheit aufgefasst wird. Bsp.: Wortschatztest, der den Gesamtwortschatz erschließen soll.
- Eine kriteriumsbezogene Validierung, wenn vom Testverfahren auf ein bestimmtes zukünftiges Verhalten (Kriterium) geschlossen wird. Bsp.: Wortschatztest als Prognose des Schul- oder Berufserfolgs, wobei der Zusammenhang zwischen Testleistung und Kriterium empirisch erwiesen werden muss.
- Eine Konstruktvalidierung, wenn vom Testverfahren auf bestimmte persönliche Eigenschaften, Einstellungen, Charakterzüge geschlossen werden soll. Bsp.: Wortschatztest zur Prüfung der verbalen Intelligenz.

3 Fazit

Validierung ist eine zweckorientierte Gültigkeitsprüfung eines Tests oder einer Meßmethode, d.h. ein Eignungsnachweis.

Die Validierung einer analytischen Methode „überprüft" die Stabilität und Präzision dieser Methode.

Definition zur Validierung

1 Alt und knapp: (Dertinger, Gänshirt, Steinigen 1984)

Validierung ist der Nachweis und die Dokumentation der Zuverlässigkeit einer Methode.

2 Die erste in der Pharma, FDA 1986

Dokumentierter Nachweis, dass ein bestimmter Prozess mit einem hohen Grad an Sicherheit kontinuierlich ein Produkt erzeugt, das vorher definierte Spezifikationen und Qualitätsmerkmale erfüllt.

3 Die vernünftigste... (Chapman, 1985)

Validierung heißt nichts Anderes als gesunder Menschenverstand - gut organisiert und gut dokumentiert.

4 Die offizielle, DIN EN ISO 8402, 1994

Bestätigen aufgrund einer Untersuchung und durch Bereitstellung eines objektiven Nachweises, dass die besonderen Forderungen für einen speziellen, beabsichtigten Gebrauch erfüllt worden sind.

Nachweisbare Informationen aufgrund von Tatsachen, die man durch Beobachtung, Messung, einen Test oder auf eine andere Art und Weise (other means) erhält.

$$\text{Validierung} \overset{?!}{\Leftrightarrow} \text{Validation}$$

5 Extrakt

Was will ich, mein Kunde?

Ich habe bitte schön zu denken.

Alles Relevante dokumentieren!

8 Das bedeutet „Validierung" für einen bekannten Gerätehersteller...

- Zitat aus einer Kundenschrift -

„Unter Validierung wird die (regelmäßige) Überprüfung der Genauigkeit eines Messgerätes verstanden. Vom Gesetzgeber wird bei Messgeräten für den Einsatz in Pharmazie und Medizin eine solche regelmäßige Geräteüberprüfung gefordert, ebenso wie für nach ISO 9000 zertifizierte Betriebe. Diese Auflage betrifft somit auch alle analytischen . . . Selbstverständlich ist das XY der Firma Z in einer Version erhältlich, die eine Validierung ermöglicht."

Validierung ist der Nachweis und die Dokumentation der Zuverlässigkeit einer Methode

Dertinger, Gänshirt, Steinigen:
GAP Praxisgerechtes Arbeiten in pharmazeutisch-analytischen Laboratorien;
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart 1984

Zuverlässigkeit z.B. Genauigkeit
Selektivität
Robustheit
Nachweisvermögen

Praktikabilität z.B. Zeitaufwand
Kosten
Schwierigkeitsgrad
Sicherheit

Die Praktikabilität ist nicht Gegenstand der Validierung!

1 Bemerkungen zur Statistik

1. Nur Aussagen über Gesamtheiten, nicht über "Einzelschicksale"
2. Keine Aussagen über kausale Zusammenhänge
3. In der SQC (Statistischen Qualitätskontrolle) ist Statistik ein Mittel, kein Selbstzweck

d.h. Zweckerfüllung und Wirtschaftlichkeit vor mathematischer Exaktheit

1.1 Messwertreihe

Wiederfindungsrate

Anzahl der Messwerte: 38

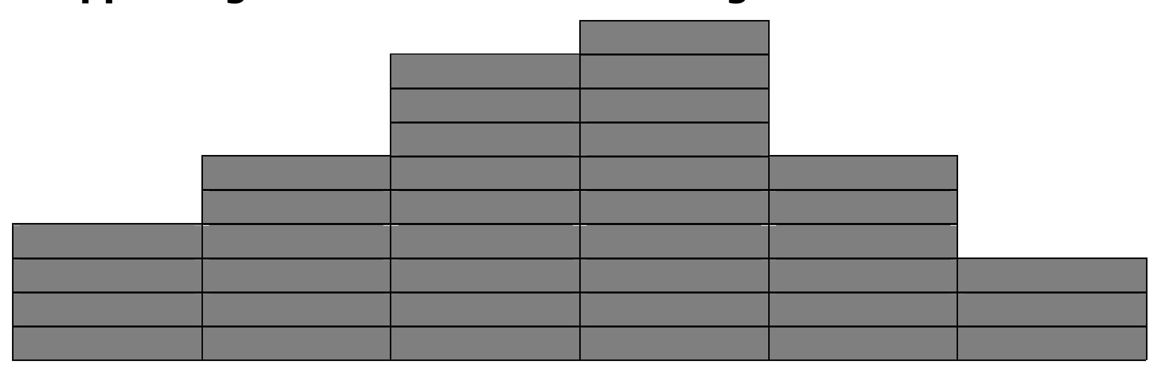
Nr.	Messwert	Nr.	Messwert
1	97	20	94
2	109	21	103
3	104	22	91
4	114	23	101
5	99	24	93
6	102	25	108
7	86	26	87
8	106	27	99
9	101	28	94
10	105	29	97
11	96	30	89
12	92	31	90
13	108	32	98
14	89	33	109
15	101	34	106
16	98	35	96
17	104	36	104
18	97	37	101
19	113	38	112

Abbildung 1: Messwertreihe

$$\text{Anzahl der Gruppen} = \sqrt{\text{Anzahl der Meßwerte}}$$

Gleichung 1 : Berechnung der Gruppenanzahl

1.2 Gruppierung der Messwerte und Histogramm



85 - 90	90 - 95	95 - 100	100 - 105	105 - 110	110 - 115
		97			
				109	
			104		
					114
		99			
			102		
86					
				106	
			101		
			105		
		96			
	92				
				108	
89					
			101		
		98			
			104		
		97			
					113
	94				
			103		
	91				
			101		
	93				
				108	
87					
		99			
	94				
		97			
89					
	91				
		98			
				109	
				106	
		96			
			104		
			101		
					112
4	6	9	10	6	3

Abbildung 2 : Histogramm und Gruppierung der Messwerte

Grundlagen der Statistik

1 Gaußsche Normalverteilung

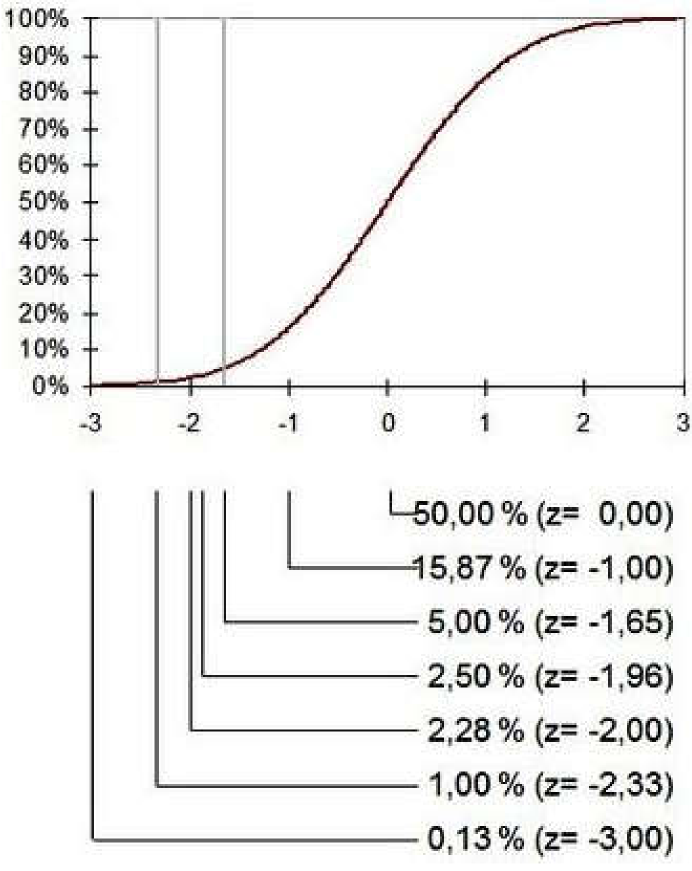


Abbildung 3 : Gaußsche Normalverteilung (Glockenkurve)

9 Prüfung auf Normalverteilung im Wahrscheinlichkeitsnetz

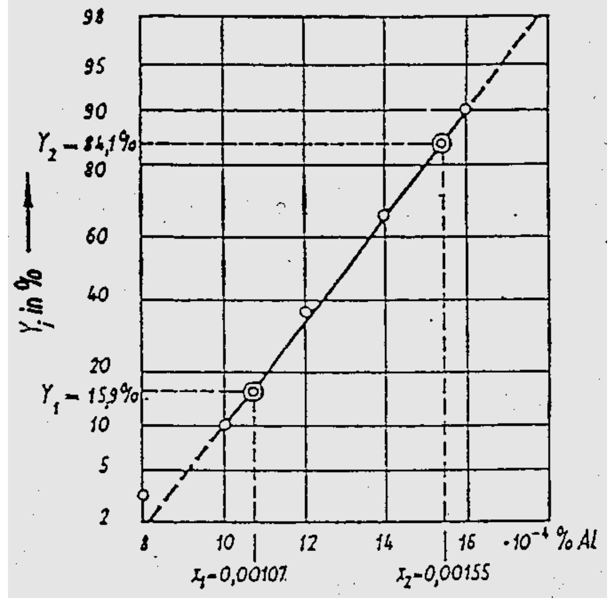


Abbildung 4 : Normalverteilung im Wahrscheinlichkeitsnetz

$$\sigma = \frac{1}{2}(x_2 - x_1)$$
$$= \frac{1}{2}(0{,}00155 - 0{,}00107)$$
$$= 0{,}00024\% \ Al$$

Gleichung 2 : Normalverteilung im Wahrscheinlichkeitsnetz

10 Eintrittswahrscheinlichkeiten bei Normalverteilung (Gaußsche Kurve)

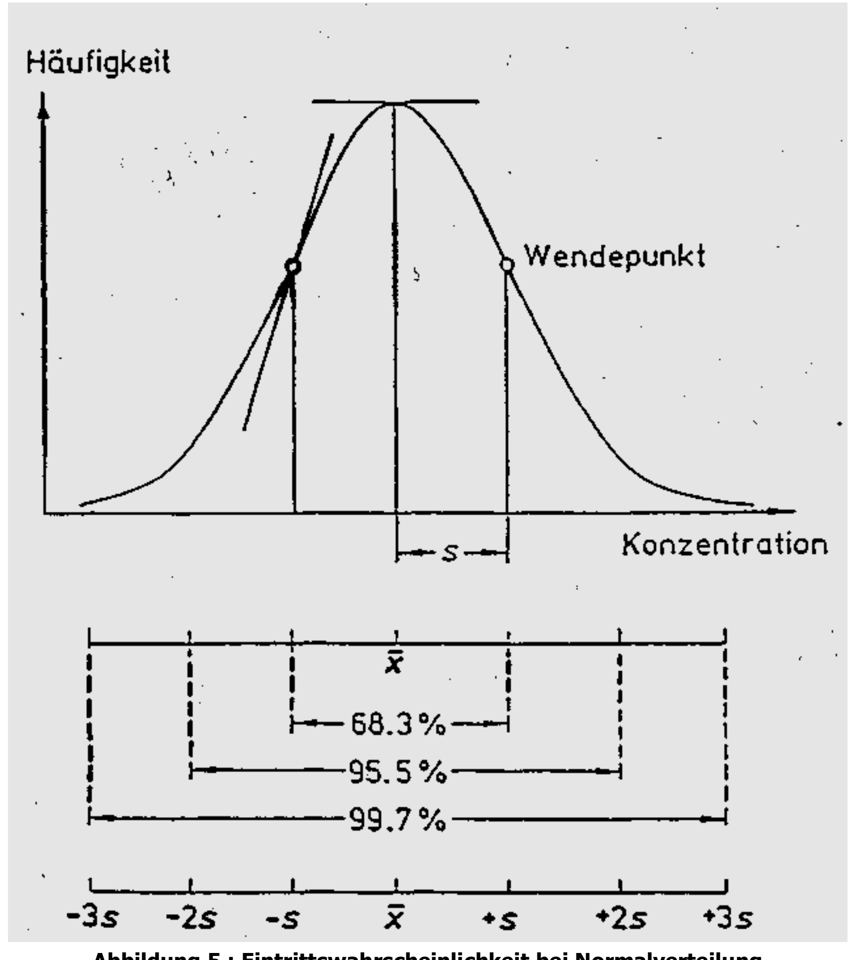


Abbildung 5 : Eintrittswahrscheinlichkeit bei Normalverteilung

s = Standardabweichung

$\bar{x}$ = Mittelwert der Einzelergebnisse

11 Integration der Gaußkurve

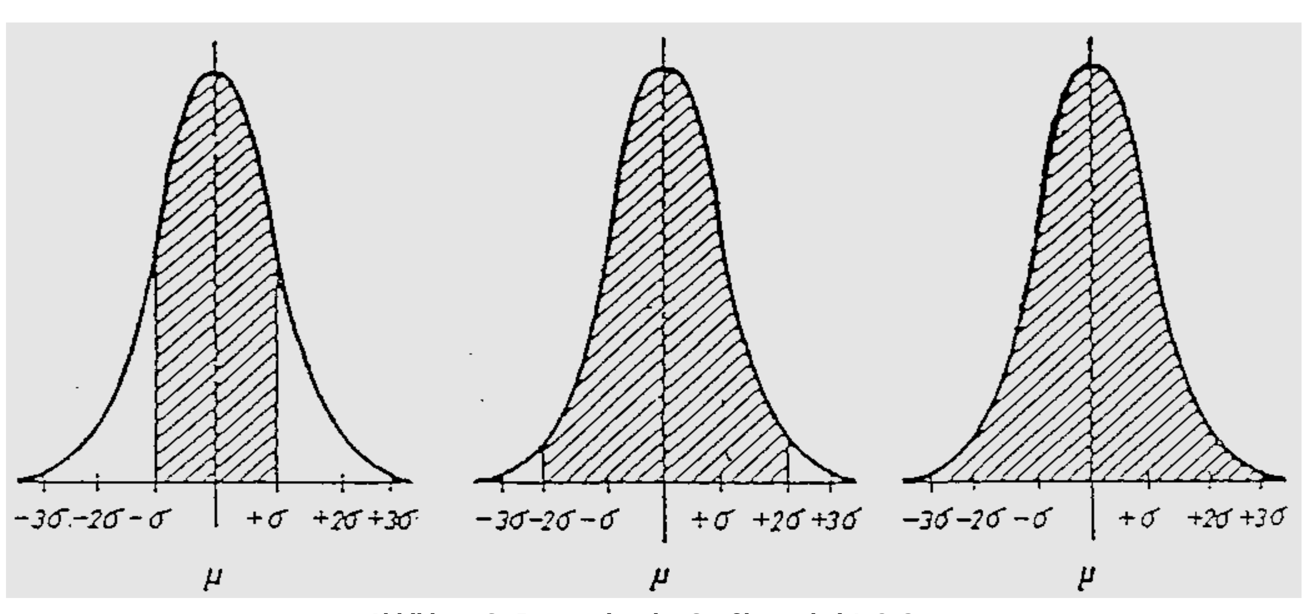


Abbildung 6 : Integration der Gaußkurve bei 1, 2, 3 σ

Die schraffierte Fläche =

68,3 % 85,0 % 99,7 %

der Gesamtfläche

12 Statistische Parameter für Häufigkeitsverteilungen

	Mittelwert (arithmetisch)	Median
Lageparameter (Richtigkeit)	$x \geq \mu \; für \; n \leq \infty$ μ : Erfahrungswert $\bar{x} = \sum x_i / n$	**Vorteil:** unempfindlich gegen Ausreißer
	Standardabweichung	**Spannweite**
Streuparameter (Präzision)	$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})}{(n-1)}}$ $s \geq \sigma \; für \; n \geq \infty$ σ^2 : Varianz $\frac{100 * s}{\bar{x}} = VK$ Variationskoëffizïent	**Nachteil:** empfindlich gegen Ausreißer, abhängig vom Umfang der Stichprobe

Tabelle 1 : Statistische Parameter für Häufigkeitsverteilungen

13 Abschätzung der Gesamtstreuung aus den Streubreiten der Einzelschritte (Additivität der Varianzen)

	Methode 1		Methode 2	
	s	s^2	s	s^2
Probenahme	3	9	7	49
Probenvorbereitung	3	9	1	1
Messung	3	9	1	1
Gesamtstreuung	?	27	?	51

Tabelle 2 : Abschätzung der Gesamtstreuung

Test auf Ausreißer

1 Grundsätzlich!

Für Ausreißertests immer P = 0,99 setzen

Vorgehensweise bei Ausreißern gehören in den SOP!

2 Ausreißertest nach Dixon

2.1 Zweck

Der Ausreißertest nach (Dean und) Dixon prüft, ob es sich bei einem Wert, der von den übrigen Werten besonders stark abweicht, um einen Ausreißer oder nur um eine zufällige starke Abweichung handelt.

Wenn es sich um einen Ausreißer handelt, darf dieser Wert gestrichen werden, man sollte ihn aber nach Möglichkeit durch einen weiteren Wert (oder mehrere Werte) ersetzen.

2.2 Vorgehen

Man bildet die Größe Q nach:

$$Q = \left(X_1 - X_2\right) / R$$

X_1 : ausreißerverdächtiger Wert

X_2: benachbarter Wert

R : Spannweite

Gleichung 3 : Berechnung von Q (nach Dixon)

Die berechnete Größe Q stellt man dem Tabellenwert Q (P, n_i) gegenüber:

n_i	P = 0,90	P = 0,95	P = 0,99
3	0.89	0.94	0.99
4	0.68	0.77	0.89
5	0.56	0.64	0.76
6	0.48	0.56	0.70
7	0.43	0.51	0.64
8	0.40	0.48	0.58

Tabelle 3 : Q-Werte nach Dixon

P : Signifikanzniveau, d.h. Wahrscheinlichkeit für die Richtigkeit der getroffenen Aussage

n_i : Anzahl der Werte, Laufzahl i

Der Ausreißer gilt als erwiesen, wenn der berechnete Wert Q größer ist als der Tabellenwert:

$$Q > Q\left(P, n_i\right)$$

Gleichung 4 : Ausreißer nach Dixon

14 Ausreißertest nach Grubbs

2.3 Zweck

Der Ausreißertest nach Grubbs prüft, ob es sich bei einem Wert, der von den übrigen Werten besonders stark abweicht, um einen Ausreißer oder nur um eine zufällige starke Abweichung handelt.

Wenn es sich um einen Ausreißer handelt, darf dieser Wert gestrichen werden, man sollte ihn aber nach Möglichkeit durch einen weiteren Wert (oder mehrere Werte) ersetzen.

Während beim Test nach Dixon nur 3 Werte einer Serie berücksichtigt werden (der Ausreißerverdächtige, sein benachbarter Wert sowie der größte bzw. kleinste Wert), berücksichtigt der Grubbs-Test alle Werte durch Bildung von Mittelwert x und Standardabweichung s.

Es kann deshalb vorkommen, dass die Tests nach Grubbs und Dixon bei identischem Datenmaterial unterschiedliche Entscheidungen über Ausreißer ergeben.

2.4 Vorgehen

Man bildet den Prüfwert PW nach:

$$PW = \left(X^{*} - X\right) / s$$

$$X^{*} = \text{ausreißerverdächtiger Wert}$$

$$X = \text{Mittelwert}$$

$$s = \text{Standardabweichung}$$

Gleichung 5 : Berechnung von PW (nach Grubbs)

Die berechnete Größe PW stellt man dem Tabellenwert der Grubbs-Tabelle für das gewünschte Signifikanzniveau P und die Anzahl N aller Werte gegenüber:

P : Signifikanzniveau, d.h. Wahrscheinlichkeit für die Richtigkeit der getroffenen Aussage

N : Anzahl der Werte

Der Ausreißer gilt als erwiesen, wenn der berechnete Prüfwert PW größer ist als der Tabellenwert:

$$PW > Tabellenwert(P,N)$$

Gleichung 6 : Ausreißer nach Grubbs

$P_{einseitig}$	90 %	95 %	99 %	$P_{einseitig}$	90 %	95 %	99 %
N				N			
3	1,148	1,153	1,155	**17**	2,309	2,475	2,785
4	1,425	1,463	1,492	**18**	2,335	2,504	2,821
5	1,602	1,672	1,749	**19**	2,361	2,532	2,854
6	1,729	1,822	1,944	**20**	2,385	2,557	2,884
7	1,828	1,938	2,097	**21**	2,408	2,580	2,912
8	1,909	2,032	2,221	**22**	2,429	2,603	2,939
9	1,977	2,110	2,323	**23**	2,448	2,624	2,963
10	2,036	2,176	2,410	**24**	2,467	2,644	2,987
11	2,088	2,234	2,485	**25**	2,486	2,663	3,009
12	2,134	2,285	2,550	**26**	2,502	2,681	3,029
13	2,175	2,331	2,607	**27**	2,519	2,698	3,049
14	2,213	2,371	2,659	**28**	2,534	2,714	3,068
15	2,247	2,409	2,705	**29**	2,549	2,730	3,085
16	2,279	2,443	2,747	**30**	2,563	2,745	3,103
$P_{zweiseitig}$	80 %	90 %	98 %	$P_{zweiseitig}$	80 %	90 %	98 %

Tabelle 4 : P-Tabelle nach Grubbs

Voraussetzungen zur Methodenvalidierung

Es muss eine schriftlich fixierte, identifizierbare Methode vorliegen. Sie sollte Angaben enthalten über:

Grundvoraussetzungen	Qualifikation (Mensch)
	Geräte (Maschine)
	Chemikalien, Reagenzien (Material)
Einsatz der Methode	Verwendungszweck
	Arbeitsbereich → Konzentrationsbereich
Durchführung	Probenvorbereitung
	Gerätejustierung und Kalibrierung
	Messung
	Auswertung
	ggf. Sicherheitshinweise

Tabelle 5 : Voraussetzungen zur Methodenvalidierung

Zusätzlich können Angaben gemacht werden zu:

Probenahme

Probenkonservierung

Sequenzaufbau bei Serienanalysen

Dokumentation

Begriffe der Methodenvalidierung

Begriff	englische Bezeichnung	Aussage über
Richtigkeit	trueness, accuracy of the mean	systematische Fehler
Präzision	precision	zufällige Fehler
Präzision unter Wiederholbedingungen, Wiederholbarkeit, Wiederholpräzision (im Laborjargon: Reproduzierbarkeit)	repeatability	laborintern, kurze Zeitabstände, 1 Anwender, 1 Gerät
Laborpräzision	Intermediate precision	laborintern, kurze Zeitabstände, verschiedene Anwender oder verschiedene Gerät
Präzision unter Vergleichsbedingungen, Vergleichbarkeit, Vergleichspräzision, Übertragbarkeit	reproducibility	verschiedene Laboratorien, identische Probe
Robustheit		Abhängigkeit des Ergebnisses von variierenden Bedingungen
Verfahrensstabilität	robustness	Störanfälligkeit durch veränderte Methoden-parameter z. B. pH, Temperatur, Salzgehalt. Unter Verfahrensstabilität wird auch die Stabilität eines Verfahrens in Abhängigkeit von der Zeit verstanden. Auch die Stabilität von Lösungen fällt hier darunter
Übertragbarkeit	ruggedness, wird immer seltener benutzt, dem Sinne nach identisch mit „reproducibility"	Störanfälligkeit durch Wechsel von Anwender, Gerät, Labor
Selektivität	selectivity	Fähigkeit zur Bestimmung mehrerer Komponenten nebeneinander
Wiederfindungsrate	recovery	Ausbeute der Probenvorbereitung
Linearität	linearity	Abhängigkeit des Signals von der Konzentration
Nachweisgrenze	Detection limit	kleinste nachweisbare Menge (Konzentration)
Bestimmungsgrenze	Quantitation limit	kleinste quantifizierbare Menge (Konzentration)
Messbereich, (dynamischer) Arbeitsbereich	range	Konzentrationsbereich für erlaubte quantitative Aussagen
Messunsicherheit, Vertrauensintervall	uncertainty of the measurement	Schwankungsbereich des Analysenergebnisses (Messwertes)
Spezifität	specifity	Störanfälligkeit der Methode gegenüber Begleitkomponenten
Genauigkeit	accuracy	Oberbegriff für Richtigkeit und Präzision (systematische und zufällige Fehler)
Erfassungsgrenze	(deutsche „Erfindung") DIN-Entwurf 32645	Kleinste Menge, die mit einem Fehlerrisiko von 5 % qualitativ bestimmt werden kann; sie ist zwischen Nachweis- und Bestimmungsgrenze angesiedelt

Tabelle 6 : Begriffe der Methodenvalidierung

Umfang einer Methodenvalidierung

	Produktanalytik von Wirkstoffen und Formulierungen	Analytik von biologischen oder Umweltmatrices
Präzision	+ +	+
Richtigkeit	+ +	+ +
Wiederfindung	+	+ +
Linearität	+	+ +
Selektivität	+	+ +
Robustheit	+ +	+ +
Nachweisgrenze	Spuren?	+ +
Bestimmungsgrenze	Spuren?	+ +

+ wichtig + + sehr wichtig

Tabelle 7 : Umfang einer Methodenvalidierung

Der Validierungsumfang ist wesentlich vom Anwendungsbereich der Methode abhängig.

Grundsatz: **Der Aufwand sollte in einem angemessenen Verhältnis zur geforderten Genauigkeit stehen.**

1 Genauigkeitsmaße

1.1 Begriffe der Qualitätssicherung und Statistik nach DIN 55350 Teil 13

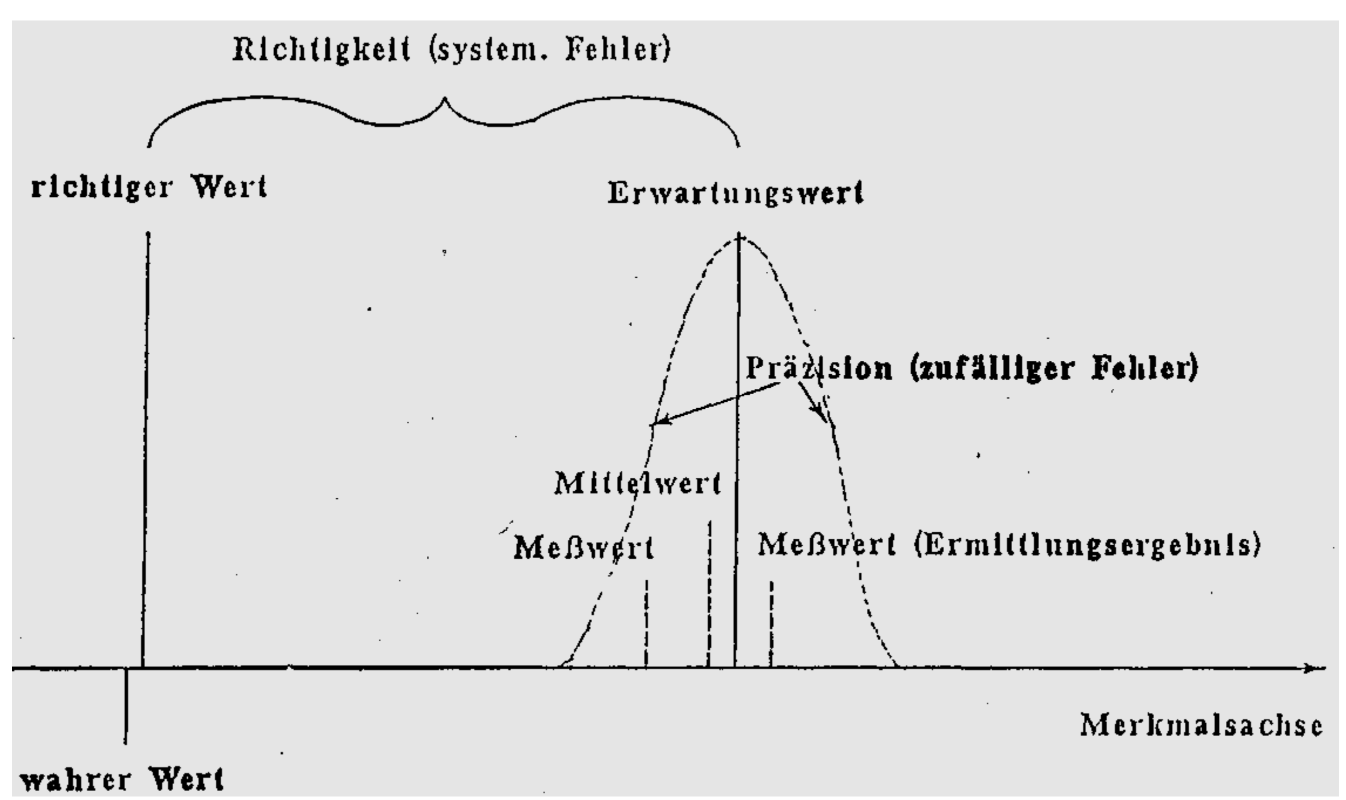


Abbildung 7 : Genauigkeitsmaße

15 Prüfung auf Richtigkeit

Möglichkeit 1	Vergleich mit unabhängiger, validierter Methode
Möglichkeit 2	Soll-/Ist Vergleich (zertifizierte Referenzprobe oder synthetische Probe)
Möglichkeit 3	Aufstockverfahren (Spiken einer Probe)

Tabelle 8 : Prüfung auf Richtigkeit

16 Prüfung auf Selektivität

Möglichkeit 1	Verhältnis der Empfindlichkeiten zweier Stoffe (Steigungen der Kalibriergeraden)
Möglichkeit 2	Prüfung auf Richtigkeit; wenn richtig, dann automatisch auch selektiv
Möglichkeit 3	Chromatographische Auflösung R (resolution) der zu trennenden Komponenten

Tabelle 9 : Prüfung auf Selektivität

Unterscheide: **Eine Methode arbeitet spezifisch, wenn sie die zu bestimmende Komponente ohne Verfälschung durch andere in der Probe vorhandene Komponenten erfasst.**

Eine Methode arbeitet selektiv, wenn sie verschiedene, nebeneinander zu bestimmende Komponenten ohne gegenseitige Störung erfasst.

17 Richtigkeit durch Methodenvergleich

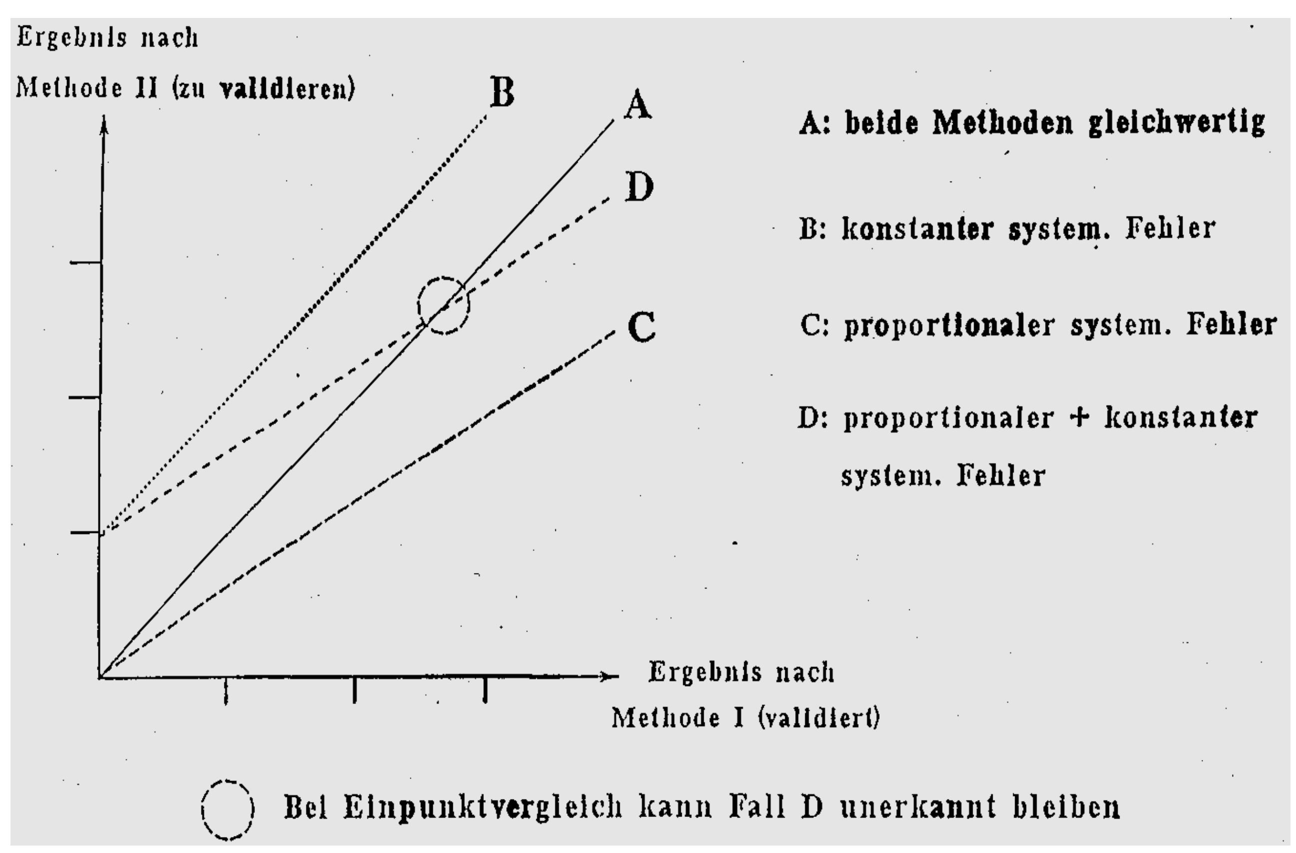


Abbildung 8 : Richtigkeit durch Methodenvergleich

18 Präzision in der Chromatographie

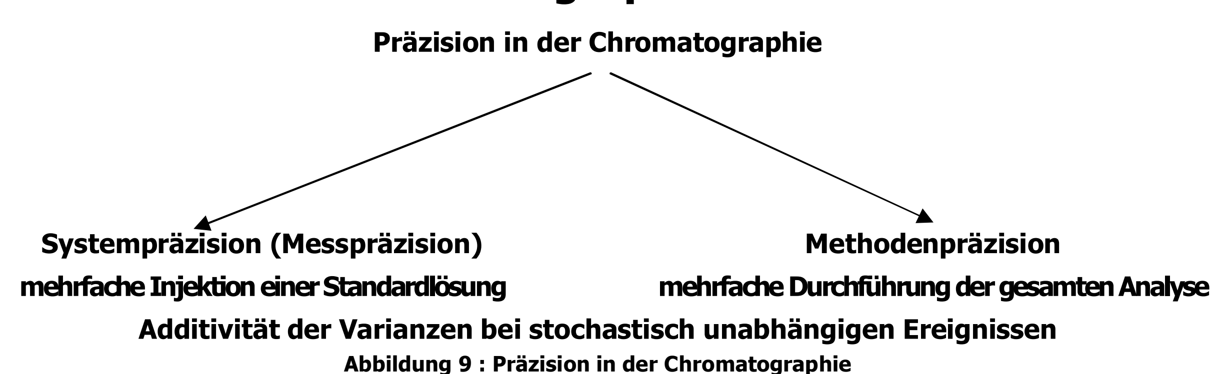


Abbildung 9 : Präzision in der Chromatographie

19 Messpräzision unter Wiederholbedingungen

Kalibrierlösung bei Sequenzbeginn 6 * injizieren!

Anhand der Messergebnisse lassen sich viele mögliche Fehler erkennen oder ausschließen:

Symptom	mögliche Ursache
zunehmende Peakflächen	Säulensättigungseffekte
	Verdunstung des Lösungsmittels
abnehmende Peakflächen	Zersetzung der Kalibrierlösung
Drift der Retentionszeiten	Chromatographisches Gleichgewicht noch nicht erreicht
	Temperaturdrift der Säule
starke Streuung der Peakflächen (im Vergleich zu Validierungsdaten)	Injektor (z.B. Luftblase)
	Kurzzeitschwankungen der Pumpe
starke Streuung der Retentionszeiten	Langzeitschwankungen der Pumpe
	schlechte Thermostatisierung der Säule

Tabelle 10 : Messpräzision unter Wiederholbedingungen

1.2 Verbesserung der Präzision durch Wiederholmessungen

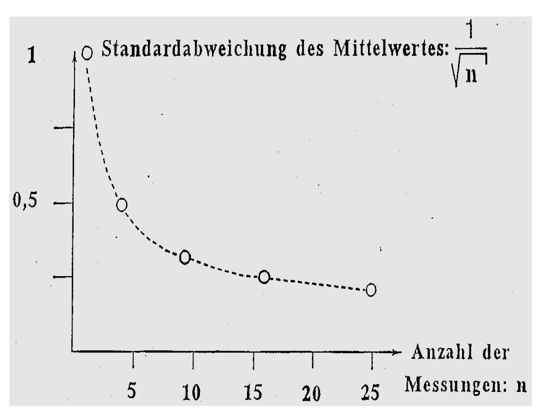


Abbildung 10 : Verbesserung der Präzision durch Wiederholmessungen

1.3 Mehrfachmessung zum leichteren Erkennen einer Mittelwertverschiebung

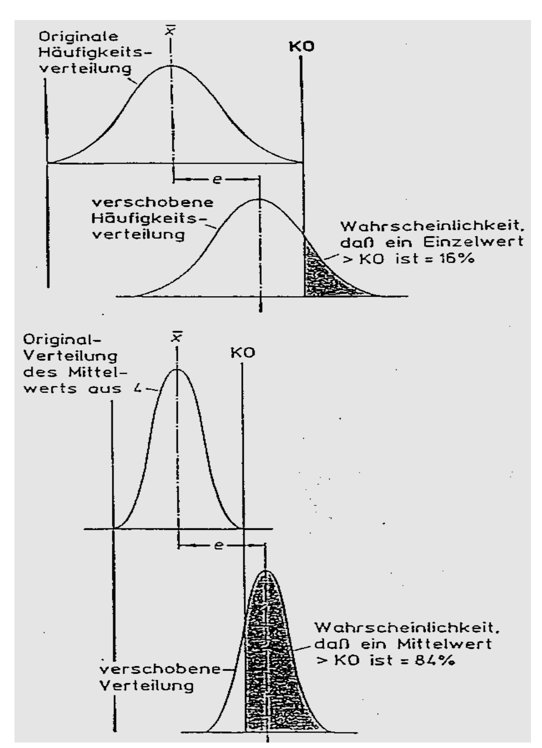


Abbildung 11 : Mehrfachmessung zum leichteren Erkennen einer Mittelwertverschiebung

Wiederholbarkeit und Vergleichbarkeit

1 Wiederholbarkeit r (DIN 51848, ISO 5725)

Unterhalb *r* kann man die absolute Differenz zweier einzelner Analysenergebnisse, die man unter Wiederholbedingungen (derselbe Laborant, dasselbe Gerät, dasselbe Labor, kurze Zeitspanne) an identischem Prüfmaterial ermittelt hat, mit einer vorgegebenen statistischen Sicherheit (meist 95 %) erwarten.

Für ein Signifikanzniveau von 95 % gilt:

$r = 2{,}83\ s_r$ (bis max. 6 Messwerte)

(s_r = Wiederholstandardabweichung)

20 Vergleichbarkeit R (DIN 51848, ISO 5725)

Unterhalb *R* kann, man die absolute Differenz zweier einzelner Analysenergebnisse, die man unter Vergleichsbedingungen (verschiedene Laboranten, verschiedene Geräte, verschiedene Labors und/oder verschiedene Zeiten) an identischem Prüfmaterial ermittelt hat, mit einer vorgegebenen statistischen Sicherheit (meist 95 %) erwarten.

Für ein Signifikanzniveau von 95 % gilt:

$R = 2{,}83\ s_R$

(s_R = Vergleichstandardabweichung)

21 Bestimmung der Wiederfindungsrate -- Aufstockverfahren

Leerprobe (Placebo) oder Probe werden aufgestockt (spiking) mit:

1. Analyt (zu bestimmende Komponente)
2. isotopenmarkiertem Analyt
3. einer dem Analyten ähnliche Modellverbindung

In den Fällen 2 und 3 stellt die Probe im Hinblick auf die bei der Messung erfasste Komponente eine Leerprobe dar.

Im Fall l werden insgesamt 3 Lösungen hergestellt:

Lösung 1: zu V_1 ml Probelösung V_2 ml Kalibrierlösung geben, man erhält Signal S_1

Lösung 2: zu V_1 ml Probelösung V_2 ml Lösungsmittel geben, man erhält Signal S_2

Lösung 3: zu V_1 ml Lösungsmittel V_2 ml Kalibrierlösung geben, man erhält Signal S_3

Die Wiederfindungsrate W errechnet sich folgendermaßen:

$$W = \frac{(S_1 - S_2)}{S_3} * 100$$

Gleichung 7 : Wiederfindungsrate

22 Wie überprüfe ich die Selektivität (Spezifizität)

- Substanz- oder elementspezifische Messung
- z.B. ^{13}C-NMR, immunologische oder enzymatische Tests, spezifische Biosensoren. Gen-Antigen-Wechselwirkungen
- Vergleichsmessung; Kontrollprobe enthält alle denkbaren Komponenten.
- Spezialfall HPLC:

Δ Trennparameter, 2 Säulen, 2 unterschiedliche Systeme

DAD, LC-MS, LC-NMR, LC-FTIR

Vergleich der Komponenten in der Kalibrierlösung und in der Probe

Üblich und gut Δ (δ) t_R?

Peakform?

Ableitungen?

Δ P_W bei 10 % Peakhöhe?

1.1 Die sicherste Methode

Off-/Online-Kopplung mit anderen Verfahren . . .

noch besser und machbar **LC-GC, LC-DC (AMD), LC-CE, LC-Immunoassay**

Und der Spektroskopie - z.B.

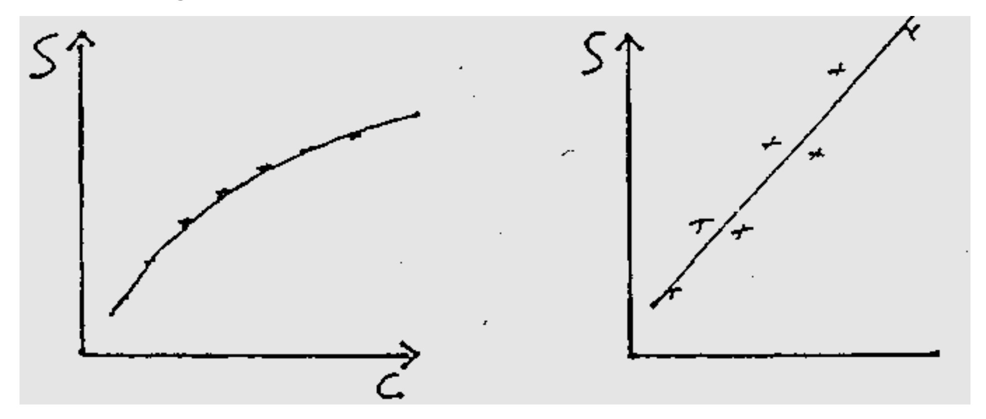
„Non plus ultra“ **LC-CE-DAD, LC-GC-MS/MS, Gelelektrophorese-LC-MS, LC_1-LC_2-NMR**

Linearität

1 Hinweis für die Praxis

Linear, b = 0	Einpunktkalibrierung
Nicht linear, b = 0	Fehler bei Einpunktkalibrierung
	Mess- und Kalibrierlösung möglichst gleiche Konzentration

Schlechte Präzision kann gute Linearität vortäuschen.



Die Linearität der Methode ist **immer** geringer als die Linearität des Detektionssystems!

ECD und FID?!

UV und Fluoreszenz?!

Spurenanalytik, unbekannte Konzentration	⇒	Linearität sehr wichtig
Produktanalytik, bekannte Konzentration Gleiche Konzentration der Probe- und Kalibrierlösung	⇒	Linearität weniger wichtig

23 Linearität / Arbeitsbereich

1.1 Linearität

- umfasst die Linearität der Response und des Gesamtverfahrens
- 5 Messpunkte sind erforderlich
- statistische Methoden sind anzuwenden, z. B. lineare Regression

⇒	Korrelationskoeffizient
⇒	Y-Achsenabschnitt
⇒	Steigung

- grafische Darstellung, ggf. mit Residualdarstellung
- Nichtlineare Zusammenhänge müssen durch mathematische Umformung linearisiert werden. Ist dies nicht möglich (Immunoassays), so ist der nichtlineare Zusammenhang durch eine geeignete Funktion zu beschreiben.

1.2 Arbeitsbereich (Range):

Innerhalb des Arbeitsbereichs müssen Linearität, Genauigkeit und Präzision den Anforderungen entsprechen

Mindest - Arbeitsbereiche:

Wirkstoffgehalt:	80 – 120 % des Sollwertes
Verunreinigungen:	Bestimmungsgrenze – 120 % der zulässigen Konzentration
Content Uniformity:	70 – 130 % des Sollwertes, gegebenenfalls noch weiter
Dissolution Test:	± 20 % über den gesamten spezifizierten Bereich

24 Bestimmung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze über das Signal / Rauschverhältnis

Nachweisgrenze: S/R = 3/1 Bestimmungsgrenze: S/R = 5/1

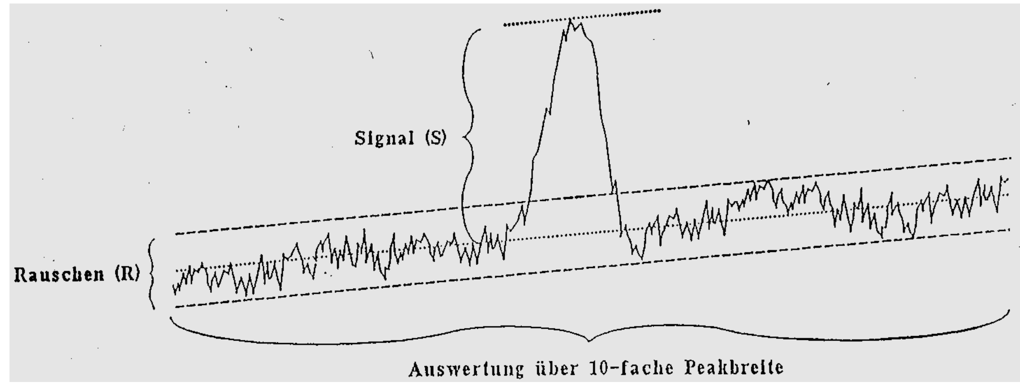


Abbildung 12 : Bestimmung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze über das Signal / Rauschverhältnis

25 α- und β-Fehler bei Blindwert- und Analysenwertverteilung

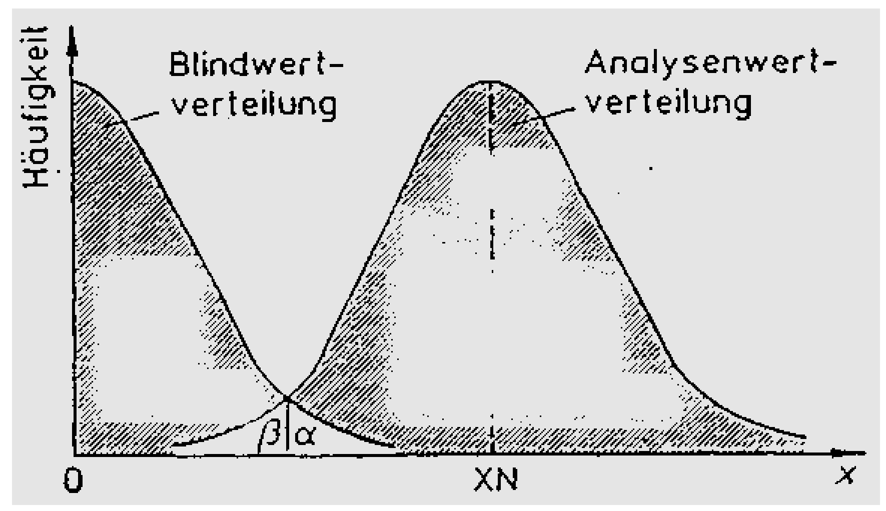


Abbildung 13 : α- und β-Fehler bei Blindwert- und Analysenwertverteilung

26 Bestimmungsgrenze in der instrumentellen Analytik

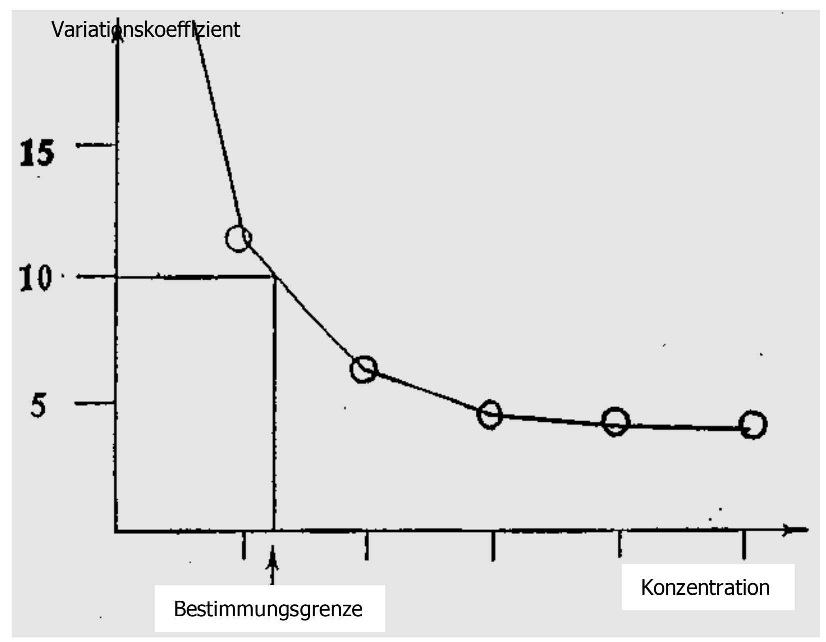


Abbildung 14 : Bestimmungsgrenze in der instrumentellen Analytik

1.3 Vorgehensweise:

Verdünnungsreihe aus Kalibrierlösungen, je 6 * analysieren

27 Prüfung auf Robustheit

	Vorteile	**Nachteile**
Möglichkeit 1		
Vergleichspräzision (Ringversuch)	objektive Kenngröße	keine inhaltliche oder fachliche Aussage
	objektive Ja/Nein Entscheidung möglich	Nachvollziehbarkeit und Transparenz sind begrenzt
	Vergleichbarkeit gewährleistet	
	universell einsetzbar	
Möglichkeit 2		
Schwachstellenanalyse durch systematische Variation der Einflussparameter	kritische Punkte werden erfasst	Aussagekraft ist von der persönlichen Qualifikation abhängig
	für Fachmann wertvolle Informationen	Kombinationseffekte nur mit viel Aufwand erfassbar
	sehr flexibel einsetzbar	
Möglichkeit 3		
Dokumentation der Erfahrungen aus dem praktischen Laboreinsatz über einen längeren Zeitraum	Praxisbedingungen werden erfasst	nicht voll GLP-tauglich (Prüfplan fehlt)
	Zusatzaufwand ist minimal	vollständige Erfassung wichtiger Parameter nicht gewährleistet
		bei Methodenänderung verlieren zurückliegende Erfahrungen ihre Aussagekraft
		für Methodenvergleich kaum geeignet

Tabelle 11 : Prüfung auf Robustheit

Nachwort

1 Was ist Mittelwert, und was bedeutet Streuung?

Ein Mensch, der von Statistik hört,
denkt dabei nur an Mittelwert.
Er glaubt nicht dran und ist dagegen,
ein Beispiel soll es gleich belegen.

Ein Jäger auf der Entenjagd,
hat einen ersten Schuss gewagt.
Der Schuss, zu hastig aus dem Rohr,
lag eine gute Handbreit vor.

Der zweite Schuss mit lautem Krach,
lag eine gute Handbreit nach.
Der Jäger spricht ganz unbeschwert,
voll Glauben an den Mittelwert:
Statistisch ist die Ente tot.

Doch war er klug und nähme Schrot
- dies sei gesagt, ihn zu bekehren -
er würde seine Chancen mehren:
Der Schuss geht ab, die Ente stürzt,
weil **Streuung** ihr das Leben kürzt.

Der Überlieferung nach von Prof. P. H. List, Marburg

Anhang

1 Beispiel zur Prüfung auf Ausreißer

Folgende Messwerte wurden durch Wiederholmessungen erhalten:

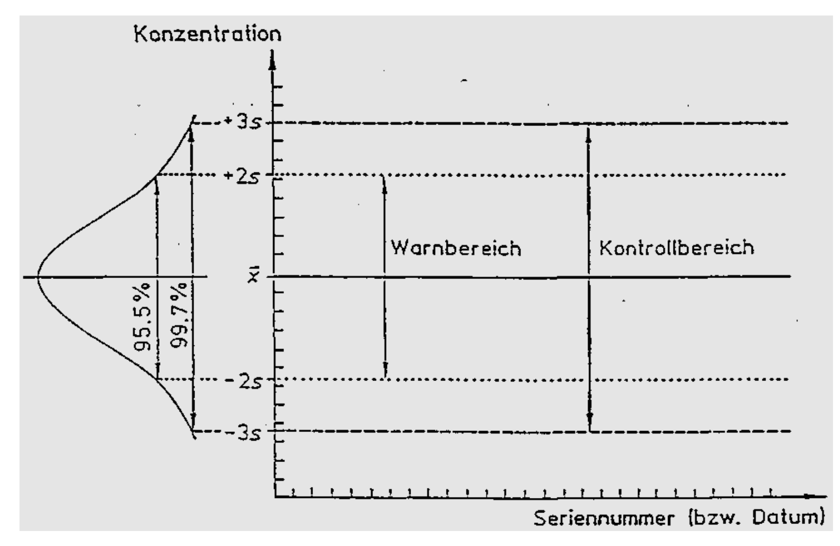
54	50
51	58
54	60
41	61

Tabelle 12 : Prüftabelle

Beurteilen Sie das Auftreten eines Ausreißers:

1) subjektiv anhand der Messwertreihe
2) subjektiv nach graphischer Darstellung
3) mittels Dixon-Test
4) mittels Grubbs-Test

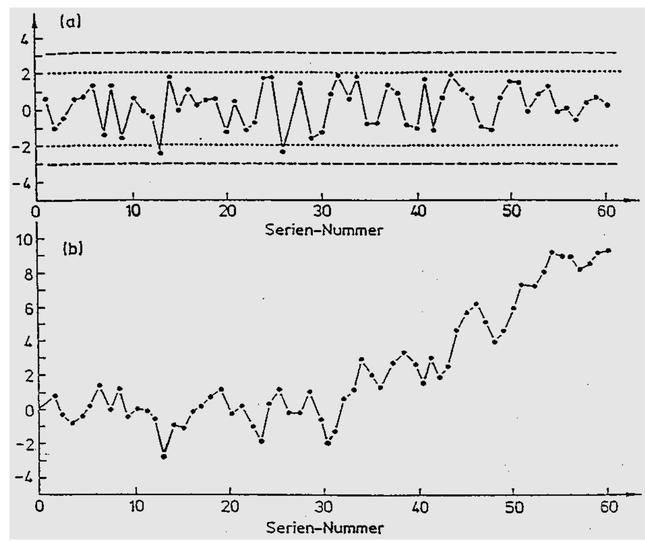
28 Prinzipieller Aufbau einer Kontrollkarte



Muster 1 : Prinzipieller Aufbau einer Kontrollkarte

Mittelwert und Standardabweichung der letzten 20 Werte als Startwert für die Qualitätskontrollkarte setzen
➔ Kontrolle der Analysengenauigkeit und Fehlerabschätzung

29 Mittelwert- und Cusum-Karte zur Driftkontrolle



Muster 2 : Mittelwert- und Cusum-Karte zur Driftkontrolle

30 Validierung der Stabilität von Kalibrierlösungen

Kalibriersubstanz: ____________________ Chargenbez.: ____________________

Konzentration: ____________________ Lösungsmittel: ____________________

Aufbewahrungsbed.: ____

Verweis auf Prüfvorschrift / SOP / Methode: ____

	Bearbeiter	**Datum**	**Urlösung eingewogen [mg]**	**Aufbewahrungsort**		
	Bearbeiter	**Datum**	**Urlösung gefundenen [mg]**	**Differenz zu Urlösung eingewogen [mg]**	**Veränderung [%]**	**Verweis auf Rohdaten-ablage**
1. Kontrolle						
2. Kontrolle						
3. Kontrolle						
4. Kontrolle						
5. Kontrolle						
6. Kontrolle						
7. Kontrolle						
8. Kontrolle						
9. Kontrolle						

$$\text{Veränderung in \%} = \frac{\text{Urlösung}_{\text{gefunden [mg]}} - \text{Urlösung}_{\text{eingewogen [mg]}}}{\text{Urlösung}_{\text{eingewogen [mg]}}} * 100$$

Haltbarkeit unter den oben angegebenen Bedingungen:

____________________ ____________________

Laborleiter Datum

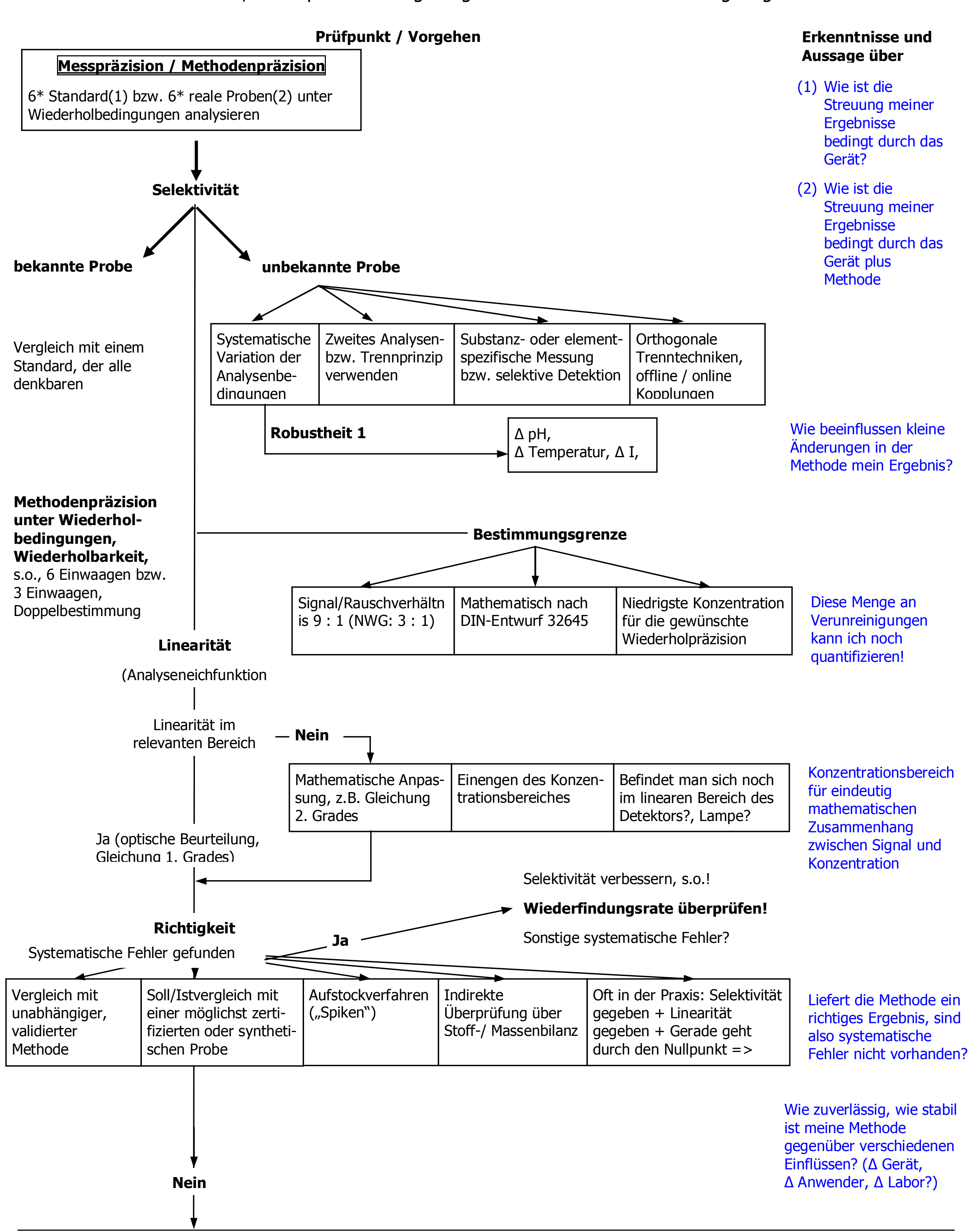
Muster 3 : Validierung der Stabilität von Kalibrierlösungen

Fließschema zur Methodenvalidierung in der Chromatographie

1 Gehaltsbestimmung, „Spurenmethode"

1.1 Dringender Hinweis

Bei Bedarf Probenahme, -Transport und –Lagerung validieren oder zumindest sorgfältig dokumentieren!



Robustheit II (Gesamtverfahren)

Methode nur für laborinterne Zwecke	**Methode wird auch außerhalb des eigenen Labors eingesetzt**
○ Wiederholpräzision (falls noch nicht ermittelt, s.o.)	● Vergleichspräzision (Übertragbarkeit)
○ Schwachstellenanalyse durch systematische Variation der kritischen Parameter	● Ringversuche

Ende der Messungen

- Ist die Methode für meinen Zweck geeignet, z.B. Streuung der Methode mit den Spezifikationsanforderungen vereinbar?
- Für welchen Konzentrationsbereich (range) sind obige Aussagen gültig?
- Wie ändern sich die erhaltenen Werte in Abhängigkeit von der Zeit? SPC einführen?
- Sind die kritischen Punkte der Methode identifiziert und herausgestellt?

Ende der Validierung

2 Umfang der analytischen Validierung

Zweck der analytischen Untersuchung	**Identifizierung**	**Verunreinigungen**		**Gehalt (Wirkstoff)**
Prüfergebnis	ja / nein	quantitativ	Grenzwert	quantitativ
Genauigkeit	-	+	-	+
Präzision				
Wiederholbarkeit	-	+	-	+
Intermediäre Präzision	-	+ (3)	-	+ (3)
Vergleichbarkeit (Reproduzierbarkeit)	-	- (1)	-	- (1)
Spezifität	+	+	+	+ (2)
Nachweisgrenze	-	+	+	-
Bestimmungsgrenze	-	+	-	-
Linearität	-	+	-	+
Arbeitsbereich	-	+	-	+

Tabelle 13 : Umfang der analytischen Validierung

- In der Regel nicht erforderlich   + In der Regel erforderlich

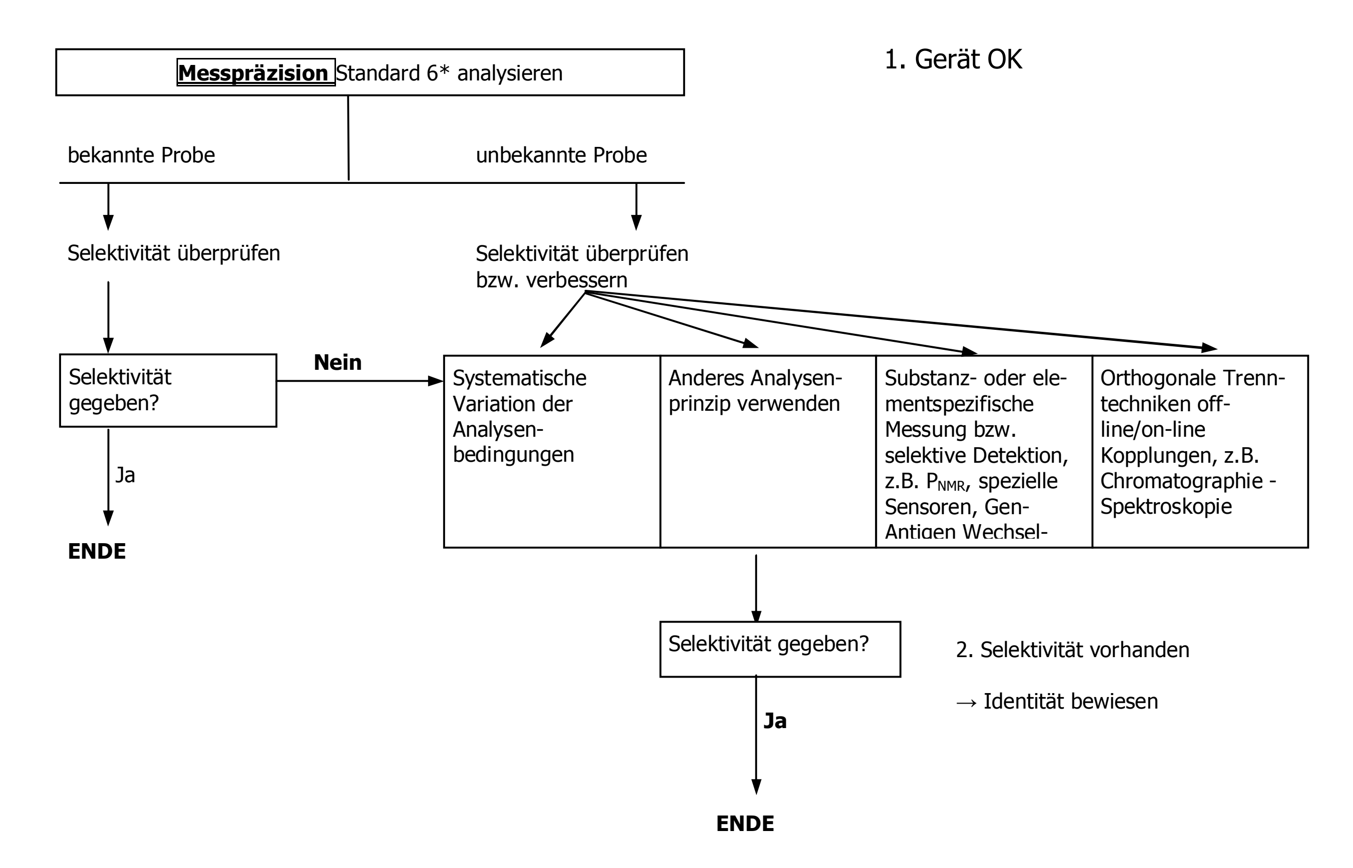
Robustheit kann in fortgeschrittener Entwicklungsphase geprüft werden.

1 Kann im Einzelfall erforderlich sein

2 Kann im Einzelfall wegfallen

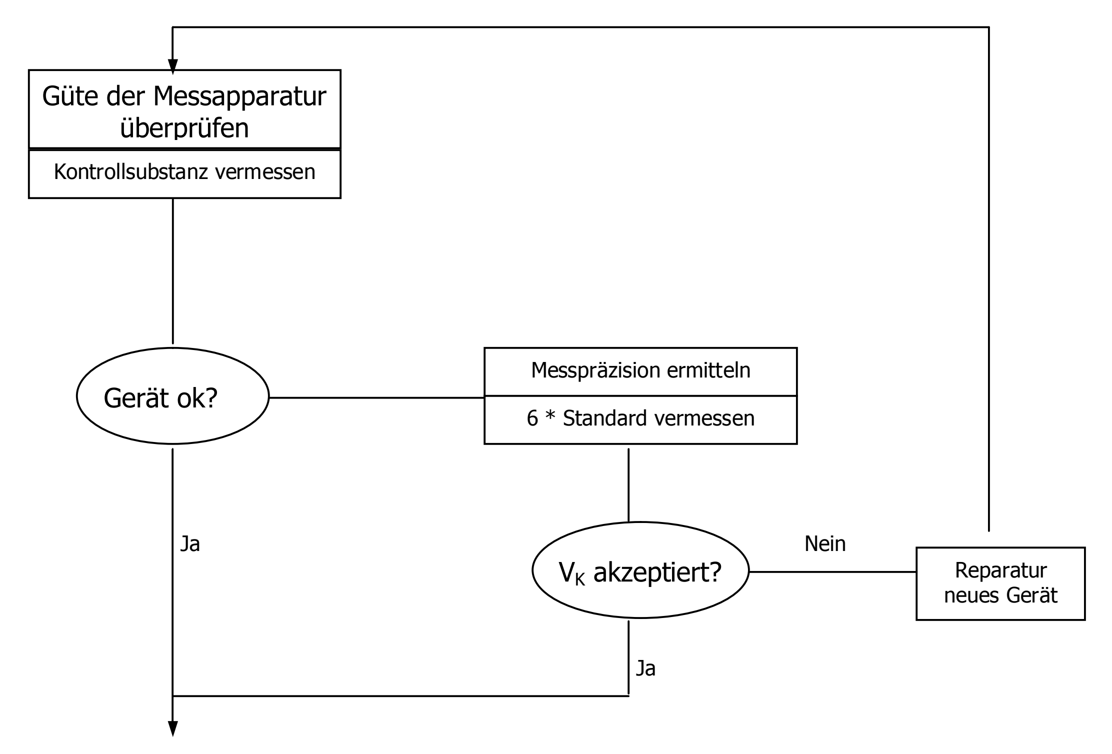
3 Sobald Vergleichbarkeit geprüft wird, kann die intermediäre Präzision entfallen

3 Identitätstest

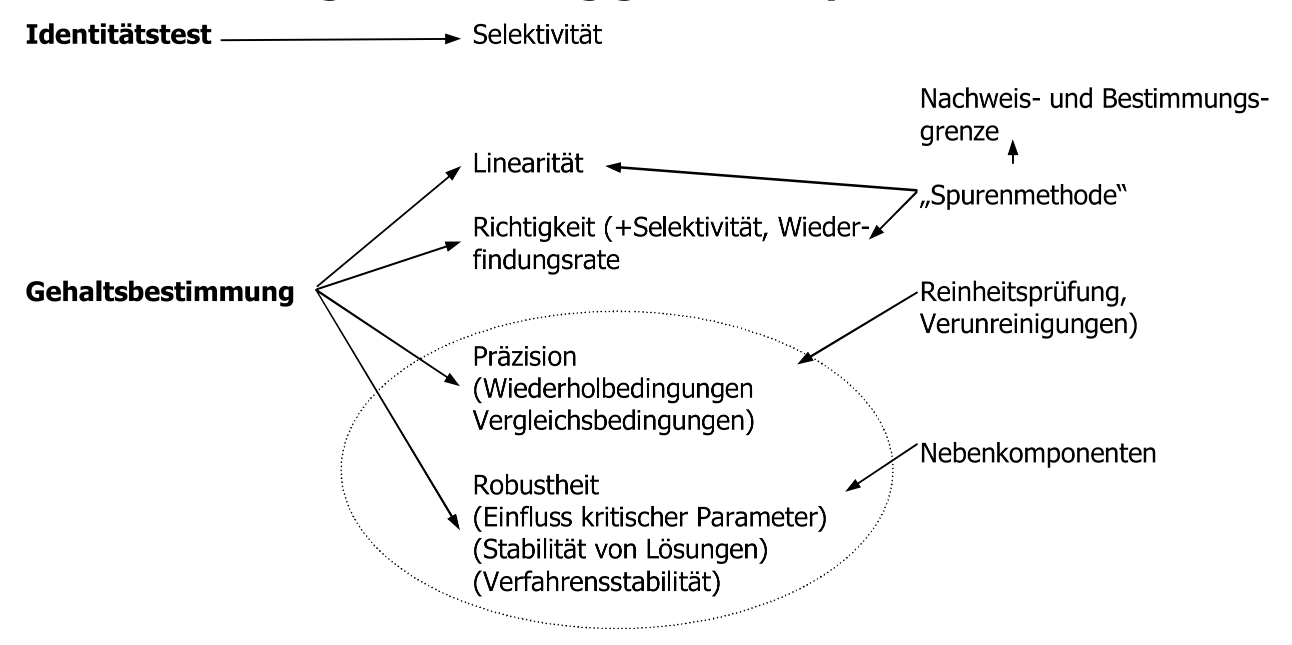


Umfang der Methodenvalidierung in der Analytik

1 Qualifizierung / Verifizierung der Messapparatur



Relevante Kenngrößen abhängig vom Analysenzweck ermitteln



Wer bestimmt Umfang und Durchführungsmodus der Validierung in der Analytik?

Umfang

1. Kunde
2. Behörde
3. Außer in der Pharma- / Pflanzenschutz-Industrie ist kein zwingender Umfang vorgegeben
4. Selbst überlegen und Umfang dem Zweck anpassen

Durchführungsmodus / Spezifikationsgrenzen

1. und 2. wie oben

Bis dato keine Norm (ISO, DIN, EN) mit verbindlichen Vorgaben

Es gibt dennoch Empfehlungen, übliche Werte, stillschweigende Vereinbarungen etc, die sich aus dem Alltag entwickelten und die in der Regel von Inspektoren, Kunden und Behörden respektiert bzw. erwartet werden.

z.B.

n = 6

95 %

NWG 3:1, BSG 9:1 (10:1)

Doppel- / Dreifachbestimmung

Messpräzision $V_K < 2$

F-, t-, Ausreißertest

Orientierungshilfen zur Validierung

A. **Vorgehensweise**

1. In-house und modifizierte Prüfverfahren
2. Prüfverfahren mit hohem Risikopotential
3. Umsatzstarke Prüfverfahren oder Produkte
4. Kritische Punkte zuerst validieren

B. **Tägliche Überprüfung der Applikation mit geringem Aufwand bringt mehr Sicherheit als halbjährliche Prüfung aller Einzelkomponenten**

C. **Kosten-Nutzen Abwägung aus Auftraggebersicht**

1 Grenzen der Validierung

- Keine Aussage über Praktikabilität und Wirtschaftlichkeit
- Ergebnisse sind nicht automatisch richtig und genau, zusätzlich wichtig:

  Gerätezustand

  Repräsentative Probenahme

  Qualifiziertes Personal

  Referenz- / Kalibriersubstanz
- Änderungen einzelner Parameter: Validierung muss mindestens teilweise wiederholt werden

Deshalb sollte man:

- Sich nicht blind auf Ergebnisse mit validierten Methoden verlassen
- Validierung als eine QS-Maßnahme unter vielen betrachten
- Den Validierungsaufwand dem Einsatzzweck anpassen
- Kritische Schritte zuerst validieren
- Vorhandenes Wissen nutzen
- Nicht nach Schema oder Checkliste vorgehen

2 Wann ist welches Werkzeug in der Qualitätssicherung sinnvoll?

- Einfaches Verfahren, Präzision des Ergebnisses nicht so kritisch:

  Gerät in Ordnung + Plausibilitätsüberprüfung
- Einmalige Fragestellung, F + „-Bereich:

  Schätzen der Messunsicherheit
- Komplexe Prozesse, viele Routinedaten, Erkenne von Trends:

  SPC
- „Offizieller" Anlass, z.B. Akkreditierung, FDA-Inspektion, Zulassung, umsatzstarkes Produkt, Risikopotential groß:

  Validierung

3 Resümee

Der Einsatz des geeigneten Werkzeuges hängt von dem Zweck, den Rahmenbedingungen der Analytik und vom Zeitpunkt der Fragestellung ab.

Die einzelnen Werkzeuge sind weniger in der Konkurrenz zu sehen, vielmehr stellen sie oft sinnvolle Ergänzungen dar: z.B.

- „½ Validierung" + SPC
- Messunsicherheit — Minivalidierung — Validierung — SPC
- 21.03.2012 — 21.07.2012 — 21.03.2013 — Lebensdauer des Verfahrens

Literatur zur Validierung

Doerffel	**Statistik in der analytischen Chemie** VEB Verlag für Grundstoffindustrie, Leipzig 1987
Funk, Dammann, Donnevert	**Qualitätssicherung in der analytischen Chemie** VCH Verlag, 1992
Arbeitskreis Eurachem/D	**Richtlinien zur Interpretation der Normenserie EN 4500 und ISO-Guide 25** Über GDCh Frankfurt erhältlich
Günzler	**Akkreditierung und Qualitätssicherung in der analytischen Chemie** Springer Verlag, 1994
Kromidas	**Qualität im analytischen Labor** VCH Verlag, 1995
Huber	**Validierung computergesteuerter Analysensysteme** Springer Verlag, 1996
Hewlett Packard	**Gute Labor Praxis** Publikationsnummer 12-5091-6259GE
Technische Mitteilungen, Nummer 2, 1995	**Validierung im Prüfwesen** **Hinweise für Prüflaboratorien und Begutachter** DACH, Frankfurt
Kromidas	**Validierung in der Analytik** VCH Verlag, 1998

Verzeichnisse

1 Abbildungsverzeichnis

2 Formelverzeichnis

3 Musterverzeichnis

4 Tabellenverzeichnis